

平成 31 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の  
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発  
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいた*in vivo*遺伝毒性予測性の向上に関する研究

研究分担者	笠松 俊夫	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部	研究員
研究協力者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	副所長
研究協力者	Petko Petkov	ブルガス大学 数理化学研究所	研究員
研究協力者	Hristiana Ivanova	ブルガス大学 数理化学研究所	研究員
研究協力者	Elena Kaloyanova	ブルガス大学 数理化学研究所	研究員
研究協力者	Ovanes Mekenyan	ブルガス大学 数理化学研究所	教授

研究要旨

*In silico* による *in vivo* 遺伝毒性予測技術の高度化・実用化を図るため、*in vitro* と *in vivo* で遺伝毒性試験結果が異なる物質に着目し、その差異となる要因を解析して、それらの知見を反映した遺伝毒性予測モデルの構築を目指した。*In vitro* の Ames 試験陰性でかつ *in vivo* げっ歯類トランスジェニック動物突然変異 (TGR) 試験陽性、あるいは *in vitro* 染色体異常 (CA) 試験陰性でかつ *in vivo* 小核 (MN) 試験陽性と報告されている物質の内、前年度にデータの妥当性が検証された Ames(-)/TGR(+) の 4 物質、CA(-)/MN(+) の 12 物質に関して、代謝に関する文献データを収集し、代謝マップを作成した。それぞれの物質について *in vitro/in vivo* の代謝の差異をもたらす要因を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 試験における暴露時間、が挙げられた。これらの知見を活用して代謝シミュレーションシステム (Tissue Metabolism Simulator System: TIMES) の改良に取り組んだ。現行の TIMES 遺伝毒性予測モデルは、データベースの代謝情報に発生確率を割り当てているが、速度論的因子は考慮されていない。今回、*in vitro* 陰性・*in vivo* 陽性の差異には試験の暴露時間が重要な因子であることが浮き彫りになったことから、代謝シミュレーションに速度論的因子を導入し、新しいモデリングを構築中である。

A. 研究目的

近年、*in vitro* 遺伝毒性試験、特に Ames 試験結果に対する *in silico* 予測モデルの開発が進み、(医薬品規制調和国際会議) ICH の M7

ガイドラインでは、遺伝毒性の判定に *in silico* 手法を用いることが許容されるなど、高い精度で遺伝毒性を予測することが可能

になってきている。

この*in silico*予測手法の発展を、より精緻な*in vivo*遺伝毒性、ひいてはヒトの健康影響の予測に繋げていくには、化学物質の遺伝子への反応性を理解するに留まらず、臓器特異性や評価物質に起こる代謝の種類やそのレベルの相違を理解し、それらの知見を反映させる仕組みが必要である。

本研究では*in vitro*と*in vivo*の代謝の違いが予測結果に与える影響に着目する。一般に*in vitro*遺伝毒性試験では、げっ歯類の肝ミクロソーム画分(S9)に補酵素を添加した代謝活性化系が用いられるが、必ずしも生体で起きる代謝を十分に反映しているわけではない。代謝酵素(特に第2相)発現の不足/欠損、また生体と比較した場合の代謝レベルの相違が*in vivo*とは異なる結果をもたらす可能性がある。

そこで*in vitro*遺伝毒性試験陰性で*in vivo*遺伝毒性試験が陽性となる物質について、これら物質の*in vitro/in vivo*代謝情報を収集、分析することで、*in vivo*特異的陽性の要因を把握する。こうして得られた*in vitro/in vivo*の代謝の違いに関する知見を代謝予測シミュレータTIMESに反映させ、Mode of Action (MoA)に基づく精緻な*in vivo*遺伝毒性予測を可能にすることを目的とした。

## B. 研究方法

まず*in vivo*特異的陽性物質を抽出する上で、利用する実データの妥当性・適切性が重要となるため、平成30年度は、既存の各種データベースから*in vitro* Ames試験 (Ames) 陰性でげっ歯類トランスジェニック突然変異試験 (TGR) 陽性となっている物質、及び*in vitro*染色体異常試験 (CA) 陰性で*in vivo* 小

核試験 (MN) 陽性と報告されている物質を探索し、原著論文等の精査により当該試験結果の妥当性を評価した。その結果、Ames陰性/TGR陽性物質は3物質 (Cyproterone acetate、Tamoxifen、Oxazepam)、*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質は12物質 (Thioacetamide、1,1,2,2-Tetrachloroethane、CI Solvent yellow 14、C.I. Direct black 38、Urethane、Chlordiazepoxide、Procabazine hydrochloride、Diazepam、Atrazine、Amphetamine、Dimethylvinyl chlorideおよびSalicylazosulfapyridine) が今後の本研究に活用すべきデータとして抽出された\*。

本年度は、これらの物質について代謝情報を収集し、代謝マップを作成、*In vitro/in vivo*の代謝の差異をもたらす要因を検証した。その結果、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が浮かび上がった。Ames陰性・TGR陽性物質、*in vitro* CA陰性・*in vivo* MN陽性物質について、どのような要因で説明できるケースかを整理し、得た知見を基に*in silico*遺伝毒性予測モデル(TIMES)の改良を試みた。

\*新たに実施された遺伝毒性試験情報より、Ames陰性/TGR陽性物質として、Methyl eugenolを追加、計4物質とした。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

## C. 研究結果

### C-1 *In vitro*陰性・*in vivo*陽性の要因

平成30年度に試験データの妥当性を確認したAmes陰性/TGR陽性の4物質、*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性の12物質について代謝に関する文献データを検索し、代謝マップ

の作成に十分な代謝情報を得た。代謝マップを作成し、*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となった主な要因について検証すると1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が挙げられた(表1A、1B)。

*In vitro*と*in vivo*の系における代謝酵素発現の違いは遺伝毒性の原因となる活性体(アラート構造)の出現の差異をもたらす可能性があり、また試験における暴露時間が異なると*in vitro*及び*in vivo*で生じる代謝産物の量が影響を受け、最終的に試験結果に影響を及ぼす可能性がある。今回検証したほとんどの物質における*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となった要因は、「代謝酵素の発現」の差異に関連していると考えられた。

### C-2 Ames陰性/TGR陽性物質

Ames陰性/TGR陽性の4物質の内、3物質(Methyl eugenol、Cyproterone acetate、Tamoxifen)では*in vitro*と*in vivo*の系における代謝酵素発現の違いが*in vitro*と*in vivo*の試験結果の矛盾に繋がっていると考えられた。*In vivo*の系では第2相の硫酸転移酵素(SULT)の活性が高いことが、これら物質の*in vivo*TGRデータが陽性であることの原因とされる。

例えば、Methyl eugenolは、SULTの働きにより反応性の高い求電子物質が産生され、遺伝毒性を示すが、*in vitro*ではSULTの発現が不十分なため、Ames試験では陰性となると考えられる。Ames試験においても、SULTの発現を補うと陽性結果が得られることが報告されている。これらの知見をもとにTIMESで、*in vitro*及び*in vivo*でのMethyl eugenolの代謝をシミュレーションしたところ、文献情報と一致する代謝マップが得られた(図1A、1B)。Methyl eugenolの*in vivo*代

謝マップに存在する第2相反応の代謝物(囲み)は、*in vitro*では得られない。この反応性代謝物が*in vivo*TGR試験結果が陽性であることの原因であり、TIMESによる*in vivo*TGR試験の予測が陽性であることと一致する。

### C-3 *In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質

*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質については12物質中8物質が、それぞれの系における代謝酵素発現の違いにより、矛盾する試験結果を得たものと考えられた。*In vitro*/*in vivo*間の代謝物の安定性の違いや第1相代謝物の一部が*in vivo*代謝系に特異的であることが、これら物質の*in vivo* MNデータが陽性であることの原因と考えられる。

例えば、C.I. Direct black 38は*in vivo* MN試験結果が陽性であるが、これは*in vivo*特異的な反応性代謝物である4-aminobiphenylを生成するためである(図2)。*In vitro*ではげっ歯類肝ミクロソームS9代謝系のアズレダクターゼ酵素活性が低いために、この代謝産物が生成せず、*in vitro* CA試験が陰性という結果に繋がっていると考えられる。

### C-4 遺伝毒性試験の暴露時間

一方で、一部の物質については、*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となった要因は、「遺伝毒性試験の暴露時間」の差異に関連していると考えられた。OECDガイドラインによれば*in vitro*のAmes試験及びCA試験の代謝活性化条件での暴露時間はそれぞれ48時間、6時間である。一方、*in vivo*TGR試験は動物への反復投与試験であり、28日間の連日投与を伴う。*in vivo* MN試験については末梢血を対象とした場合、単回投与後の試料採取は最大72時間が許容されている。このように*in vivo*遺伝毒性試験の方がより試験期間が長く、さらに*in vivo*では第1相水酸化反応が顕著で

あるため、代謝物による酸化的遺伝子損傷が起りやすい。

例えば、*in vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質であるジアゼパムは、標的臓器の骨髄で有意な活性酸素種の生成が報告され、酸化ストレスが*in vivo*陽性結果の原因と示唆される。*In vitro*試験では暴露時間が短いため、このような持続的なストレスが起らず陰性結果が得られたと考えられる。

こうして収集した遺伝毒性試験結果と対応する代謝情報をTIMESに反映させると同時に、今回明らかとなった*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となる要因の一つ、「遺伝毒性試験の暴露時間」を反映すべく、代謝シミュレーションに速度論的因子を導入することを検討した。

#### C-5 代謝シミュレータへの速度論因子の導入

TIMESはトキシコキネテックスとトキシコダイナミクスとを組み合わせる単一のモデリングプラットフォームとしたソフトウェアであり、トキシコキネテックス部分では代謝情報に基づく代謝物の予測が行われ、トキシコダイナミクス部分である毒性メカニズムに基づく警告構造(アラート)と照合される。その結果、親化合物、親化合物と代謝物、または代謝物のみが遺伝毒性を示す(あるいは示さない)と判定される。現行のTIMESでは代謝物の予測に速度論的な概念が含まれていない。これまでに収集した代謝情報から、起り得る(酵素的反応と非酵素的反応から成る)生体内変換反応をリスト化(変換表)し、各変換反応に対して、文献情報や専門家知識また実験データを再現できるように計算された発生確率が割り当てられる。

3,3-Dimethyl-1-(4-methylphenyl)triazene をモデル化合物として、この発生確率を実験で求められた速度論的データを用いて再評価した。遺伝毒性試験の暴露時間も考慮した時間の関数とし、シミュレーションを行った結果を図3A, 3Bに示す。代謝マップ自体は非速度論的なシミュレーション(図3A)と速度論的なそれ(図3B)とよく似ているが、唯一の違いは速度論的なシミュレーションで見出されたDNA付加体の生成(図3Bにて強調表示)である。このDNA付加体の生成が遺伝毒性試験での陽性原因となると考えられるが、最終的に陽性に至るかどうかの判定には生成量も加味しなければならず、陽性となる閾値を設定する必要がある。このモデルリングについては、各種データと突き合わせて整合性を確認し、適用化合物を広げるべく、引き続き検討中である。

#### D. 考察

*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成した結果、1) 代謝酵素の発現、と2) 遺伝毒性試験の暴露時間、の相違が浮かび上がった。*In vitro*の代謝活性化(げっ歯類肝ミクロソームS9)系に、代謝酵素、特に第2相代謝酵素の発現が不足、あるいは欠如していることが知られていたが、*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の原因となることが改めて確認された。今回実施したような信頼性の高い*In vitro/in vivo*遺伝毒性試験のデータの収集と検証を通じて、*in vivo*特異的な代謝活性化を受けやすい物質や構造が特定されれば、*in silico*手法による予測性の向上に繋がることが期待できる。

*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異のもう一つ

の主因、遺伝毒性試験の暴露時間の相違については、現行の*in silico*遺伝毒性予測モデルに速度論的視点を取り入れた改良の必要性を認識させた。試験プロトコル上の暴露時間の違いによって陽性・陰性が分かれるのは、本来、本質的な問題ではないのかもしれないが、この課題をきっかけに速度論的な考えを取り込んだ精緻なシミュレーションができるようになることが、将来ヒト健康リスクを評価する際、対象物質への暴露形態や期間に合わせて臨機応変な予測をする上で役立つはずである。現在、代謝物の生成を時間軸でシミュレートできるようモデリングを進めている。(代謝物を含む) 遺伝毒性物質がDNAやタンパク質などの標的分子と結合し、その結合量が一定量以上になると遺伝毒性を示すと考えることができることから、この一定量を閾値として遺伝毒性の有無を予測するモデルを、まず*in vitro*のAmes/CA試験について、その次に*in vivo*のTGR/MN試験について開発できるよう検討を進めている。

## E. 結論

*In vivo*遺伝毒性予測性の向上へ向けて*in vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成し代謝の差異を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現と2) 遺伝毒性試験における暴露時間、の相違が浮かび上がった。得られた知見を基に代謝シミュレータTIMESの改良を図り、*in vivo*特異的な代謝を反映できるようにすると同時に、速度論的因子を導入した新しいモデリングを構築中である。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) StarDropを活用した香料化合物の*in silico*遺伝毒性評価の試み, 笠松俊夫, 北澤愛莉, 田島澄恵, 金子昌弘, 本間正充, 第6回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第48回大会 合同大会 (2019年11月 東京)
  - 2) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する*in silico*アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第47回構造活性相関シンポジウム (2019年12月 熊本)
  - 3) Improvement of Ames test database for developing QSAR prediction models. Kasamatsu T, Kitazawa A, Sugiyama K, Suzuki T, Honma M. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2020, Anaheim, USA)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表 1A *In vitro/in vivo* の試験結果差異の検証 (Ames 陰性/TGR 陽性物質)

#	CAS	Chemical name	<i>in vitro</i> Ames data	<i>in vivo</i> TGR data	Factor affecting metabolic difference
1	10540-29-1	Tamoxifen	Negative	Positive	Enzyme expression
2	427-51-0	Cyproterone acetate	Negative	Positive	Enzyme expression
3	93-15-2	Methyl eugenol	Negative	Positive	Enzyme expression
4	604-75-1	Oxazepam	Negative	Positive	Durations of tests

表1B *In vitro/in vivo* の試験結果差異の検証 (*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質)

#	CAS	Chemical name	<i>in vitro</i> CA data	<i>in vivo</i> MNT data	Factor affecting metabolic difference
1	62-55-5	Thioacetamide	Negative	Positive	Enzyme expression
2	79-34-5	1,1,2,2-Tetrachloroethane	Negative	Positive	Enzyme expression
3	51-79-6	Urethane	Negative	Positive	Enzyme expression
4	1937-37-7	C.I. Direct black 38	Negative	Positive	Enzyme expression
5	58-25-3	3H-1,4-Benzodiazepin-2-amine,7-chloro-N-methyl-5-phenyl-,4-oxide	Negative	Positive	Enzyme expression
6	513-37-1	2,2-dimethylvinyl chloride	Negative	Positive	Enzyme expression
7	599-79-1	Sulfasalazine	Negative	Positive	Enzyme expression
8	366-70-1	Procarbazine hydrochloride	Negative	Positive	Enzyme expression
9	439-14-5	Diazepam	Negative	Positive	Durations of tests
10	1912-24-9	Atrazine	Negative	Positive	Durations of tests
11	300-62-9	Amphetamine	Negative	Positive	Durations of tests
12	842-07-9	1-Phenylazo-2-naphthol (CI Solvent yellow 14)	Negative	Positive	Durations of tests

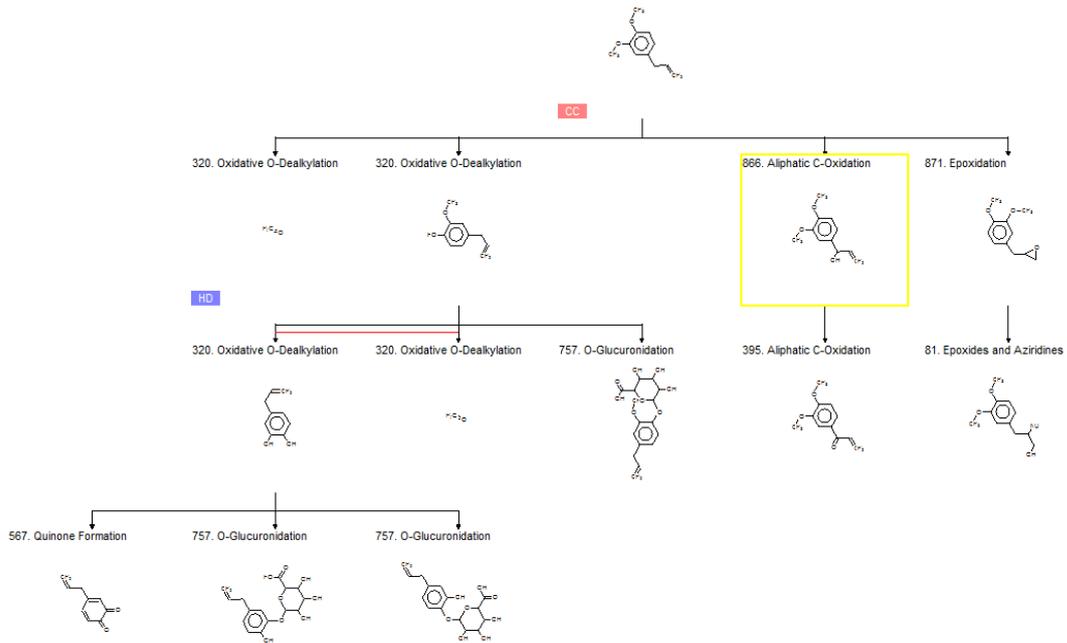


図1A *In vitro*におけるMethyl eugenolのラットS9/マイクロソーム代謝マップのシミュレーション

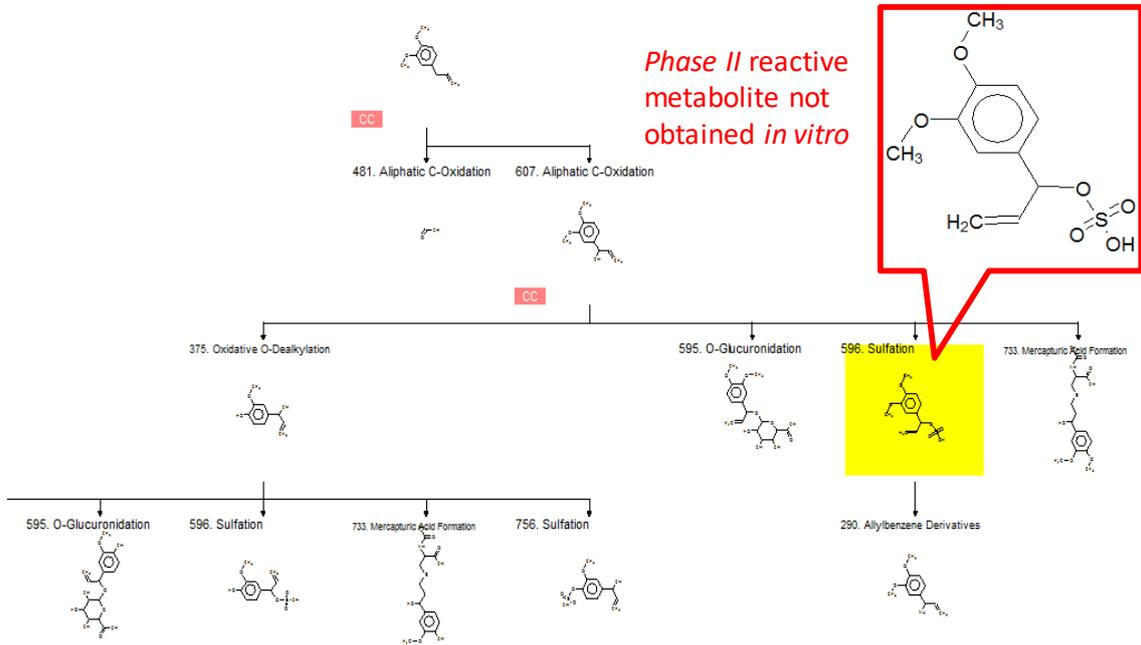


図1B *In vivo*におけるMethyl eugenolの代謝マップのシミュレーション

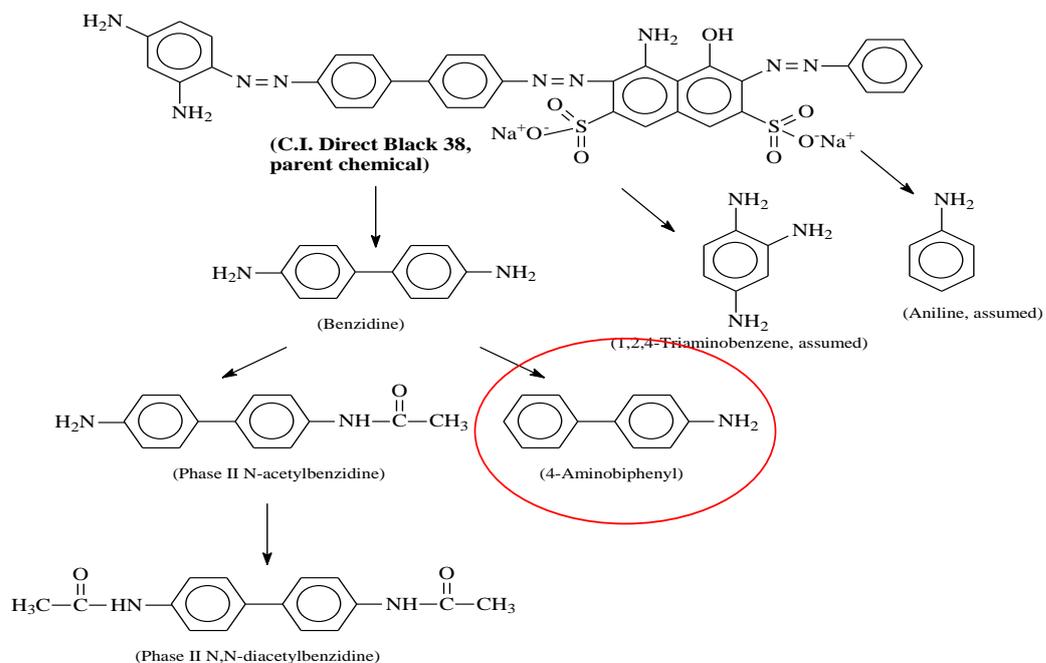


図2 ハムスターにおける C.I. Direct black 38 の代謝系路

### Non-kinetics metabolic simulator

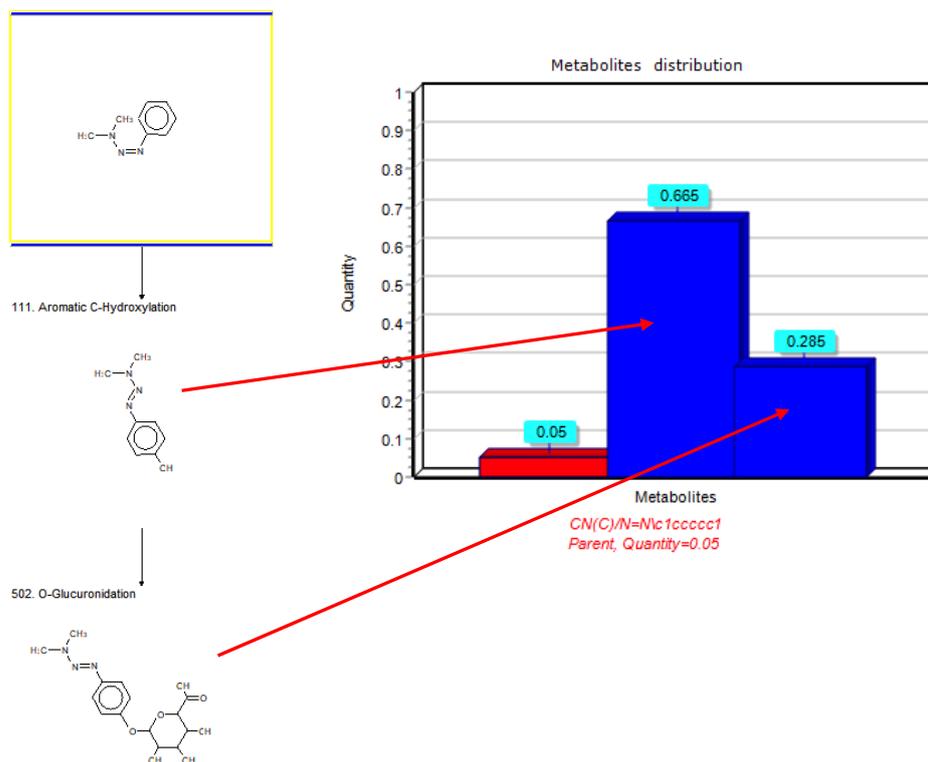


図3A 非速度論的な *in vitro* 肝 S9 代謝シミュレータによるシミュレーションにおける 3,3-Dimethyl-1-(4-methylphenyl)triazene の親化合物と代謝物量

## Kinetics metabolic simulator

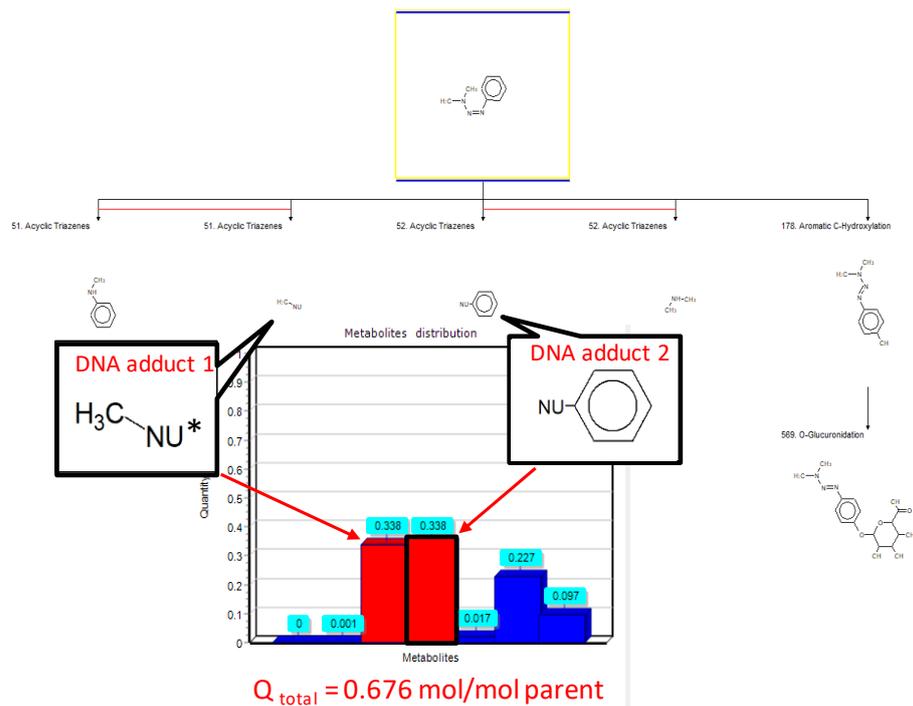


図 3B 速度論的な *in vitro* 肝 S9 代謝シミュレータによるシミュレーションにおける 3,3-Dimethyl-1-(4-methylphenyl)triazene の親化合物と代謝物量 (Nu は求核剤)